

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. September 2003 (18.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/076655 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/02712

(22) Internationales Anmeldedatum:  
14. März 2003 (14.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 11 321.1 14. März 2002 (14.03.2002) DE  
60/380,073 3. Mai 2002 (03.05.2002) US

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): GNOTHIS HOLDING SA [CH/CH]; CH-1015 Ecublens (CH).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RIGLER, Rudolf [AT/CH]; 115, rue du Centre, CH-1025 St-Sulpice (CH). HONEGGER, Adrian [CH/CH]; General-Guisan-Str. 31, CH-4144 Arlesheim (CH). DÖRRE, Klaus [DE/CH]; 44, rue de la Pontaise, CH-1018 Lausanne (CH).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwälte: WEICKMANN, Franz, Albert usw.; Weickmann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München (DE).

WO 03/076655 A2

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING A NUCLEIC ACID ANALYTE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG EINES NUKLEINSÄUREANALYTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying a nucleic acid analyte by carrying out a hybridization with two or more hybridization probes.

(57) Zusammenfassung: Das Verfahren betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Nukleinsäureanalyten durch Hybridisierung mit zwei oder mehreren Hybridisierungssonden.

## Verfahren zur Bestimmung eines Nukleinsäureanalyten

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Nukleinsäureanalyten durch Hybridisierung mit zwei oder mehreren Hybridisierungssonden.

- 10 Die Verwendung von Molecular Beacons als Hybridisierungssonden zum Nachweis von Nukleinsäure-Zielmolekülen in einer Probe ist bekannt (siehe US-Patent 5,607,834). Molecular Beacons enthalten üblicherweise eine sogenannte Hairpinstruktur bestehend aus einem Stem mit zwei zueinander komplementären Sequenzabschnitten und einem Loop, eine Fluoreszenz-
- 15 markierungsgruppe und eine Quenchgruppe. Die nicht mit dem Zielmolekül bindefähige Stemsequenz dient dazu, die Fluoreszenzmarkierungsgruppe und die Quenchgruppe in Nachbarschaft zu halten, wenn die Sonde nicht an den Analyten gebunden ist. Auf diese Weise werden Photonen, die durch die Fluoreszenzmarkierungsgruppe absorbiert werden, nicht als
- 20 Fluoreszenzphotonen emittiert, sondern die Energie wird auf die Quenchgruppe übertragen. Die Loop-Sequenz ist mit dem nachzuweisenden Zielmolekül komplementär. Bei Bindung der Sonde an das Zielmolekül öffnet sich der Loop und hybridisiert mit dem Zielmolekül. Auf diese Weise wird die Fluoreszenzmarkierungsgruppe aus der Nachbarschaft der
- 25 Quenchgruppe entfernt, wodurch Fluoreszenz auftritt und gemessen werden kann. Molecular Beacons werden insbesondere für homogene Nachweisverfahren eingesetzt, bei denen es nicht möglich oder wünschenswert ist, Hybridisierungsprodukte der Zielnukleinsäure und der Sonde aus einem Überschuss der Hybridisierungssonden zu isolieren, wie
- 30 etwa bei der Echtzeit-Überwachung von Polymerase-Kettenreaktionen.

- 2 -

Weiterhin ist die Verwendung einer Kombinationen von Hybridisierungs sonden in einem Nachweisverfahren bekannt, wobei eine Sonde eine Fluoreszenz-Donorgruppe und die andere Sonde eine Fluoreszenz-Akzeptorgruppe trägt. Bei der Hybridisierung beider Sonden an  
5 eine Ziel-Nukleinsäure kann ein nachweisbarer Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptorgruppe erfolgen (siehe z.B. US-Patent 4,996,143).

Bei einem Nachweis von Ziel-Nukleinsäuremolekülen durch gleichzeitige Bindung von zwei oder mehr unterschiedlichen Hybridisierungs sonden sind  
10 unerwünschte Wechselwirkungen (Anregung mit einer Wellenlänge, aber Nachweis in beiden Kanälen) ein großes Problem, das zu einer Verschlechterung der Sensitivität und einer Erhöhung der Messdauer führt. Dieses Problem besteht insbesondere bei der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie, bei der nur wenige Moleküle bzw. sogar nur  
15 Einzelmoleküle nachgewiesen werden sollen.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht darin, ein Verfahren zur Bestimmung von Nukleinsäure-Analyten zu entwickeln, bei dem die oben genannten Nachteile zumindest teilweise vermieden  
20 werden können.

Diese Aufgabe wird durch Verwendung von mindestens zwei miteinander korrespondierenden Hybridisierungs sonden gelöst. Diese korrespondierenden Hybridisierungs sonden werden derart ausgewählt, dass  
25 sie eine Hairpinstruktur aufweisen, wobei die Loop-Abschnitte der Hairpins die zu einem Nukleinsäure-Analyten komplementären Sondensequenzen umfassen. Die Stems werden durch zwei zueinander komplementäre Armsequenzen gebildet, die an den Enden der Sondensequenzen angeordnet sind. Darüber hinaus sind die Stems beider Sondenmoleküle  
30 komplementär untereinander. Die Auswahl von Stem- und Loopsequenzen ist derart, dass ein zwischen dem Loop und einer komplementären Sequenz des Analyten gebildetes Hybrid stabiler als das Hybrid der komplementären

- 3 -

Sequenzen der Stems ist. Dies kann durch entsprechende Einstellung der Länge oder/und des G/C-Anteils der jeweiligen hybridisierenden Bereiche erfolgen.

- 5 Beide Hybridisierungssonden werden weiterhin so ausgewählt, dass sie benachbart zueinander, vorzugsweise in unmittelbarer Nachbarschaft ohne Zwischenraum zwischen an den Analyten binden, wobei die benachbarten Stemabschnitte der Sonden zusätzlich miteinander hybridisieren. Eine erste Markierungsgruppe ist vorzugsweise 3'-Ende der ersten Sonde angebracht
- 10 und eine zweite Markierungsgruppe ist vorzugsweise am 5'-Ende der zweiten Sonde angebracht. Nach Hybridisierung an den Analyten und der zusätzlichen Hybridisierung zwischen den beiden Sonden hält der Stem die beiden Markierungsgruppen, vorzugsweise Lumineszenz- bzw. Fluoreszenzmarkierungsgruppen, in geringem räumlichen Abstand zueinander. Auf
- 15 diese Weise ist eine Wechselwirkung zwischen beiden Markierungsgruppen, beispielsweise ein Energietransfer zwischen einer Energiedonor- und einer Energieakzeptorgruppe, möglich. So kann eine Lumineszenz- bzw. Fluoreszenz-Donorgruppe mit einem Laser angeregt werden, die ihre Energie auf die Akzeptorgruppe überträgt und diese zur
- 20 Fluoreszenz anregt. Die Fluoreszenz der Akzeptorgruppe wird dann nachgewiesen. Alternativ oder zusätzlich kann die Analyse des Messsignals eine zeitaufgelöste Bestimmung umfassen.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung eines

25 Nukleinsäure-Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Probe, die den Analyten enthalten kann,
  - (b) Bereitstellen von mindestens zwei mit dem Analyten bindefähigen Hybridisierungssonden, die jeweils unterschiedliche Markierungsgruppen tragen, und, wenn sie nicht an den Analyten
- 30 gebunden sind, in einer Hairpinstruktur umfassend einen Stem mit zwei zueinander komplementären Abschnitten und einen Loop umfassend die mit den Analyten bindefähige Sequenz vorliegen,

- 4 -

- wobei eine erste Hybridisierungssonde benachbart von einer zweiten Hybridisierungssonde an den Analyten binden kann,  
wobei die Markierungsgruppen der beiden Hybridisierungssonden derart angeordnet sind, dass sie, wenn die Sonden an den Analyten gebunden sind, eine Wechselwirkung miteinander eingehen können,  
5 wobei die Sequenzen in den Stems der ersten und zweiten Hybridisierungssonden untereinander komplementär sind, dass, wenn die Sonden an den Analyten gebunden sind, eine Hybridisierung zwischen Sequenzen aus den Stems der ersten und der zweiten Sonde erfolgen kann,  
10 (c) Inkontaktbringen der Probe mit den Hybridisierungssonden unter Bedingungen, bei denen eine Hybridisierung der Sonden mit dem Analyten erfolgen kann, und  
(d) Nachweisen der gleichzeitigen Hybridisierung von mindestens zwei  
15 Sonden mit dem Analyten.

Die durch das Verfahren bestimmten Nukleinsäure-Analyten, z.B. DNA oder/und RNA, können aus biologischen Proben, insbesondere aus Säugern, wie dem Menschen, aber auch aus anderen Organismen, z.B.  
20 Mikroorganismen, stammen. Darüber hinaus können auch Analyten nachgewiesen werden, die *in vitro* aus biologischen Proben erzeugt worden sind, cDNA-Moleküle, die durch reverse Transkription aus mRNA hergestellt worden sind. Die für das Verfahren verwendete Probe stammt vorzugsweise aus einem Organismus, z.B. aus Gewebe oder  
25 Körperflüssigkeit eines Organismus, insbesondere aus einem Menschen.

Das Verfahren kann beispielsweise zu einer Analyse der Genexpression, z.B. zur Ermittlung eines Genexpressionsprofils, oder zur Analyse von Mutationen, z.B. Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP), eingesetzt werden.  
30 Das Verfahren eignet sich jedoch auch zur Bestimmung enzymatischer Reaktionen an Nukleinsäuren, beispielsweise zur Bestimmung von

- 5 -

Nukleinsäureamplifikationsreaktionen, insbesondere in einem oder mehreren Thermocycling-Prozessen.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzten  
5 Hybridisierungs sonden sind vorzugsweise Oligonukleotide, insbesondere  
DNA-Moleküle. Es können jedoch auch entsprechende  
Nukleinsäureanaloga, wie etwa Peptidnukleinsäuren (PNA), Locked  
Nukleinsäuren (LNA) oder andere Nukleotidanaloga, eingesetzt werden. Die  
Länge der Hybridisierungs sonden kann grundsätzlich wie bei bekannten  
10 Sonden gewählt werden und liegt üblicherweise im Bereich von 20 bis 200  
Nukleotiden.

Die Hybridisierungs sonden beinhalten Markierungsgruppen, vorzugsweise  
Fluoreszenzmarkierungsgruppen, die sich mindestens in einem  
15 Messparameter, insbesondere ausgewählt aus Emissionswellenlänge und  
Dauer der Fluoreszenz, unterscheiden. Besonders bevorzugt enthält eine  
Sonde eine Donormarkierungsgruppe und die andere Sonde eine  
Akzeptormarkierungsgruppe, wobei ein Energietransfer zwischen Donor-  
und Akzeptormarkierungsgruppe stattfinden kann.

20 Der Nachweis der Analyten erfolgt dadurch, dass die Bindung beider  
Sonden an den Analyten ermittelt wird. Vorzugsweise umfasst die  
Bestimmung den Nachweis eines Energietransfers zwischen den  
Markierungsgruppen der ersten und zweiten Sonde. Geeignete  
25 Kombinationen von Donor- und Akzeptormarkierungsgruppen für einen  
derartigen Energietransfers (FRET) sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B.  
US-Patent 4,996,143).

Das erfindungsgemäße Verfahren kann jedoch auch eine sogenannte  
30 Kreuzkorrelationsbestimmung umfassen, bei der mindestens zwei  
unterschiedliche Markierungen, insbesondere Fluoreszenzmarkierungen,  
eingesetzt werden, deren korreliertes Signal bestimmt wird. Die

- 6 -

grundsätzliche Durchführung einer solchen Kreuzkorrelationsbestimmung ist beispielsweise bei Schwille et al. (Biophys. J. 72 (1997), 1878-1886) und Rigler et al. (J. Biotechnol. 63 (1998), 97-109) beschrieben.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren beruht darauf, dass man eine Kombination von Hybridisierungssonden verwendet, die an benachbarte Sequenzabschnitte des Analyten hybridisieren. Vorzugsweise verwendet man eine Kombination von Sonden, wobei die erste Sonde an einen Bereich des Analyten bindet, der unmittelbar 3'-seitig desjenigen Bereichs liegt, an  
10 den die zweite Sonde bindet. In diesem Fall trägt die erste Sonde ihre Markierungsgruppe günstigerweise unmittelbar in ihrem 3'-Ende und die zweite Sonde ihre Markierungsgruppe am 5'-Ende. Auf diese Weise liegt bei der Bindung beider Sonden an den Analyten ein oder sehr geringer Abstand zwischen beiden Markierungsgruppen vor, durch den eine  
15 Wechselwirkung, z.B. Energietransfer zwischen beiden Markierungsgruppen, erleichtert wird.

Die beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Hybridisierungs-  
sonden sind vorzugsweise sogenannte Molecular Beacons, die bei Bindung  
20 an den Analyten eine Steigerung der Signalstärke der Markierungsgruppe aufweisen. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, wenn das Signal der Markierungsgruppe durch das Vorhandensein einer Quenchgruppe auf der Sonde mindestens teilweise gelöscht wird, wenn die Sonde nicht an den Analyten gebunden ist. Die Steigerung der Signalstärke  
25 erfolgt vorzugsweise um mindestens den Faktor 2, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 5.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise mit geringen Konzentrationen des in der Probe vorhandenen Analyten bzw. der  
30 Hybridisierungssonden sowie mit einem sehr geringem Probenvolumen durchgeführt. Das Probenvolumen liegt vorzugsweise im Bereich von  $\leq 10^{-6}$  l und besonders bevorzugt  $\leq 10^{-8}$  l. Zur Bestimmung solcher Proben kann

- 7 -

als Träger eine Mikrowellstruktur mit mehreren Vertiefungen zur Aufnahme von Probeflüssigkeit verwendet werden, wobei die einzelnen Wells beispielsweise einen Durchmesser zwischen 10 und 1 000  $\mu\text{m}$  aufweisen. Geeignete Mikrostrukturen sind z.B. in DE 100 23 421.6 und DE 100 65  
5 632.3 beschrieben. Weiterhin kann der Träger Temperaturelemente, z.B. Peltier-Elemente, beinhalten, die eine Temperaturregelung des Trägers oder/und einzelner Probenbehälter in ihm ermöglichen.

10 Der für das Verfahren verwendete Träger ist zweckmäßigerweise so ausgestattet, dass er eine optische Detektion der Probe ermöglicht. Vorzugsweise wird daher ein zumindest im Bereich der Probenbehälter optisch transparenter Träger verwendet. Der Träger kann dabei entweder vollständig optisch transparent sein oder eine optisch transparente Basis  
15 und eine optisch undurchlässige Deckschicht mit Aussparungen in den Probenbehältern enthalten. Geeignete Materialien für Träger sind beispielsweise Verbundstoffträger aus Metall (z.B. Silizium für die Deckschicht) und Glas (für die Basis). Derartige Träger können beispielsweise durch Aufbringen einer Metallschicht mit vorgegebenen  
20 Aussparungen für die Probenbehälter auf das Glas erzeugt werden. Alternativ können Plastikträger, z.B. aus Polystyrol oder Polymeren auf Acrylat- oder Methacrylatbasis, eingesetzt werden. Weiterhin ist bevorzugt, dass der Träger eine Abdeckung für die Probenbehälter aufweist, um während der Messung ein geschlossenes und von der Umgebung im  
25 Wesentlichen isoliertes System bereitzustellen.

Weiterhin können im Träger elektrische Felder, insbesondere im Bereich der Probenbehälter, erzeugt werden, um eine Konzentrierung der zu bestimmenden Analyten im Messvolumen zu erreichen. Beispiele für  
30 Elektroden, die zur Erzeugung solcher elektrischer Felder geeignet sind, sind z.B. in DE 101 03 304.4 beschrieben.



- 8 -

Besonders bevorzugt erfolgt der Nachweis des Analyten durch Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS). Dabei erfolgt vorzugsweise die Messung von einem oder wenigen Analytmolekülen in einem Messvolumen, welches Teil des Probenvolumens ist, wobei die  
5 Konzentration der zu bestimmenden Analytmoleküle vorzugsweise  $\leq 10^{-6}$  mol/l beträgt und das Messvolumen vorzugsweise  $\leq 10^{-14}$  l ist. Es werden dabei von den Markierungsgruppen der Hybridisierungs sonden stammende Messsignale durch Lumineszenzmessung ermittelt. Auf Einzelheiten zu apparativen Details des Verfahrens und zur Durchführung des Verfahrens  
10 geeigneter Vorrichtungen wird auf EP-B-O 679 251 verwiesen.

Alternativ kann die Detektion auch durch zeitaufgelöste Abklingmessung, ein sogenanntes Time/Gating erfolgen, wobei das Signal der Markierungsgruppen, z.B. die Fluoreszenz, innerhalb des Messvolumens  
15 angeregt werden und anschließend vorzugsweise in einem zeitlichen Abstand von  $\geq 100$  ps das Öffnen des Detektionsintervalls am Detektor erfolgt. Diese Messmethode ist beispielsweise von Rigler et al. in "Ultrafast Phenomena" D.H. Auston, Hrsg., Springer 1984, beschrieben.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird eine konfokale Einzelmolekülanalyse so durchgeführt, dass der Abstand zwischen dem Messvolumen in der Probenflüssigkeit und der Fokussieroptik der zur Anregung von Fluoreszenz-Markierungsgruppen in der Probenflüssigkeit verwendeten Lichtquelle  $\geq 1$  mm und die  
25 Probenflüssigkeit eine Lichtquelle, insbesondere von der Fokussier-Optik thermisch isoliert ist. Ein derartiges Verfahren und eine hierfür geeignete Vorrichtung ist beispielsweise in DE 101 11 420.6 beschrieben. Durch thermische Isolierung der Probenflüssigkeit von apparativen Komponenten kann die Temperatur der Probe unabhängig eingestellt und während des  
30 Verfahrens variiert werden. Somit können temperaturveränderliche Prozesse, z.B. die Bestimmung von Nukleinsäuren-

- 9 -

Hybridisierungsschmelzkurven oder die Bestimmung von Nukleinsäure-Amplifikationsreaktionen, durchgeführt werden.

5 Der Träger ist vorzugsweise eine Mikrostruktur mit mehreren, vorzugsweise mindestens  $10^2$  Behältnissen zur Aufnahme einer Probeflüssigkeit, wobei die Probeflüssigkeit in den separaten Behältnissen aus einer oder mehreren Quellen stammen kann. Das Einbringen der Probeflüssigkeit in die Behältnisse des Trägers kann z.B. mittels einer piezoelektrischen Flüssigkeitsabgabe-Vorrichtung erfolgen.

10 Die Behältnisse des Trägers sind so ausgestaltet, dass sie eine Bindung des Nachweisreagenz mit dem Analyten in Lösung ermöglichen. Vorzugsweise handelt es sich bei den Behältnissen um Vertiefungen in der Trägeroberfläche, wobei diese Vertiefungen grundsätzlich eine beliebige  
15 Form aufweisen können, z.B. kreisförmig, quadratisch, rautenförmig etc. Der Träger kann auch  $10^3$  oder mehr separate Behältnisse umfassen.

Die optische Anregungseinrichtung umfasst eine stark fokussierte Lichtquelle, vorzugsweise einen Laserstrahl, der mittels entsprechender  
20 optischer Einrichtungen auf das Messvolumen in der Probenflüssigkeit fokussiert wird. Die Lichtquelle kann auch zwei oder mehrere Laserstrahlen enthalten, die dann jeweils vor Eintritt in die Probeflüssigkeit durch unterschiedliche Optiken auf das Messvolumen fokussiert wird. Die Detektionseinrichtung kann beispielsweise einen fasergekoppelten  
25 Avalanche-Fotodiodendetektor oder einen elektronischen Detektor enthalten. Es können jedoch auch Anregungs- oder/und Detektions-Matrices, bestehend aus einer Punktmatrix von Laserpunkten, erzeugt durch eine Diffraktionsoptik oder einen Quanten-Well-Laser sowie einer Detektormatrix, erzeugt durch eine Avalanche-Fotodiodenmatrix oder  
30 elektronische Detektormatrix, z.B. eine CCD-Kamera, verwendet werden.

- 10 -

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Lichtquelle einen oder mehrere Laserstrahlen, die mittels Leiten durch ein oder mehrere diffraktionsoptische Elemente in multiple Foci aufgespalten werden, wie in DE 101 26 083.0 beschrieben.

5

Der Träger kann in vorgefertigter Form bereits gestellt werden, wobei in mehrere separate Behältnisse des Trägers lumineszenzmarkierte Nachweisreagenzien, vorzugsweise lumineszenzmarkierte Hybridisierungs-  
10 sonden bzw. -primer, eingefüllt werden. Anschließend wird der die Nachweisreagenzien enthaltende Träger günstigerweise getrocknet.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein vorgefertigter Träger bereitgestellt, der eine Vielzahl von separaten, z.B. 100 Behältnissen enthält, in die jeweils unterschiedliche Nachweisreagenzien, z.B.  
15 Reagenzien zum Nachweis einer Nukleinsäurehybridisierung, wie Primer oder/und Sonden, eingefüllt vorliegen. Dieser Träger kann dann mit einer aus einem zu untersuchenden Organismus, z.B. einem menschlichen Patienten, stammenden Probe gefüllt werden, so dass in den jeweiligen Behältnissen unterschiedliche Analyten aus einer einzigen Probe bestimmt  
20 werden. Derartige Träger können beispielsweise zur Erstellung eines Genexpressionsprofils, z.B. für die Diagnostik von Krankheiten, oder zur Bestimmung von Nukleinsäurepolymorphismen, z.B. zum Nachweis einer bestimmten genetischen Prädisposition, verwendet werden.

25 Vorzugsweise werden als Markierungsgruppen Fluoreszenzmarkierungen verwendet, wie etwa Fluorescein, Rhodamin, Phycoerythrin, CY3, CY5 oder Derivate davon. Die Unterscheidung der Fluoreszenzmarkierungsgruppen kann über die Emissionswellenlänge, über die Lebensdauer der angeregten Zustände oder über eine Kombination davon erfolgen.

30

Darüber hinaus betrifft die Erfindung auch einen Reagenzienkit zur Bestimmung von Nukleinsäureanalyten, umfassend

- 11 -

mindestens zwei mit dem Analyten bindefähige Hybridisierungssonden, die jeweils unterschiedliche Markierungsgruppen tragen, und, wenn sie nicht an den Analyten gebunden sind, in einer Hairpinstruktur umfassend einen Stem mit zwei zueinander komplementären Abschnitten und einen Loop

5 umfassend die mit den Analyten bindefähige Sequenz vorliegen, wobei eine erste Hybridisierungssonde benachbart von einer zweiten Hybridisierungssonde an den Analyten binden kann, wobei die Markierungsgruppen der beiden Hybridisierungssonden derart angeordnet sind, dass sie, wenn die Sonden an den Analyten gebunden

10 sind, eine Wechselwirkung miteinander eingehen können, wobei die Sequenzen in den Stems der ersten und zweiten Hybridisierungssonden untereinander komplementär sind, dass, wenn die Sonden an den Analyten gebunden sind, eine Hybridisierung zwischen Sequenzen aus den Stems aus der ersten und der zweiten Sonde erfolgen

15 kann.

Dieser Reagenzienkit wird vorzugsweise für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt.

20 Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung von Interferenz bei der Kreuzkorrelation besteht darin, eine zeitaufgelöste Messung durch Time-Gating durchzuführen. Dieses Verfahren kann gegebenenfalls auch unabhängig von den zuvor beschriebenen Sonden für die Bestimmung von (beliebigen) Analyten durch Kreuzkorrelation oder Koinzidenzanalyse mittels

25 optischer Anregung von mehreren lumineszierenden Molekülen in einem oder mehreren konfokalen Detektionsvolumina durchgeführt werden. Hierbei werden mehrere an den Analyten gebundene spektral unterscheidbare Markierungsgruppen repetitiv mit hoher Pulsfrequenz, die in der Größenordnung der Totzeit des Detektors liegt, vorzugsweise im

30 Bereich von 10 bis 0,1 MHz (entsprechend Zeitintervallen von 0,1-10  $\mu$ s), z.B. von etwa 1 MHz (entsprechend 1  $\mu$ s), angeregt. Dabei können durch entsprechende elektronische Hintergrundanalyse unter Berechnung einer

- 12 -

Korrelations- oder/und Koinzidenzkurve "korrekt" auftretende Korrelationssignale von Hintergrundsignalen unterschieden werden, die durch eine unerwünschte Interferenz (Crosstalk) beider Markierungsgruppen entstehen.

5

Die Erfindung umfasst vorzugsweise die Kombination von drei Technologien, nämlich:

- (i) Mehrfarbendetektion, vorzugsweise unter Verwendung eines Anregungslasers,
- 10 (ii) Kombination von Molecular Beacon-Hybridisierungssonden, derart, dass nur bei Bindung an den richtigen Analyten ein Energietransfer zwischen den beiden Markierungsgruppen der Hybridisierungssonden erfolgen kann und
- (iii) spezifischer Nachweis des Zielmoleküls durch multiple Laser-  
15 Anregung unter Erzeugung einer zum spezifischen Nachweis des Analyten geeigneten Koinzidenz-Funktion.

Das Verfahren eignet sich besonders beim Nachweis von Einzelmolekül-Analyten durch konfokale Detektion, vorzugsweise mittels Fluoreszenz-  
20 Korrelationsspektroskopie. Aufgrund der im Rahmen der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie vorherrschenden geringen Konzentrationen an Analyten und Hybridisierungssonden findet nahezu kein unspezifischer Energietransfer zwischen beiden Markierungsgruppen statt. Durch  
geeignete statistische Datenauswertung kann eine hohe Sensitivität  
25 erreicht werden. Das Verfahren erlaubt eine Kreuzkorrelationsbestimmung mit nur einer einzigen Anregungslichtquelle, insbesondere einem einzigen Laser. Unerwünschte Interferenzen zwischen den Markierungsgruppen können durch Verwendung der Molecular Beacon-Sonden weitgehend ausgeschaltet werden. Dies führt insgesamt zu einer signifikanten  
30 Erhöhung der Sensitivität gegenüber bekannten Fluoreszenz-korrelationsspektroskopischen Nachweisverfahren.

Figur 1 zeigt eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Eine Probe, die einen Nukleinsäureanalyten (T) enthält, wird mit einem Nachweisreagenz in Kontakt gebracht, umfassend zwei Hybridisierungssonden ( $S_1$ ,  $S_2$ ), die als Hairpin-Strukturen mit jeweils einem Stem und einem Loop vorliegen. Die Sonde  $S_1$  bindet unmittelbar 3'-seitig der Sonde  $S_2$  an die Ziehnukleinsäure T. Die Sonde  $S_1$  weist an ihrem 3'-Ende eine erste Fluoreszenzmarkierungsgruppe ( $F_1$ ) und an ihrem 5'-Ende eine Quenchgruppe ( $Q_1$ ) auf. Die Sonde  $S_2$  weist an ihrem 5'-Ende eine zweite Fluoreszenzmarkierungsgruppe ( $F_2$ ) und an ihrem 3'-Ende eine Quenchgruppe ( $Q_2$ ) auf. Wenn die Sonden nicht an den Analyten (T) gebunden sind, befinden sich die Fluoreszenzmarkierungsgruppen und die Quenchgruppen in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft, so dass ein von den Fluoreszenzgruppen stammendes Signal zumindest teilweise gelöscht wird. Bei Bindung an den Analyten wird die räumliche Nähe der Fluoreszenzmarkierungsgruppen ( $F_1$ ,  $F_2$ ) gegenüber den Quenchgruppen ( $Q_1$ ,  $Q_2$ ) aufgehoben, so dass sie eine höhere Fluoreszenzintensität aufweisen.

Bei Bindung an den Analyten sind die beiden Fluoreszenzmarkierungsgruppen ( $F_1$ ,  $F_2$ ) in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander angeordnet, da der 5'-seitige Stemabschnitt von  $S_2$  mit dem 3'-seitigen Stemabschnitt von  $S_1$  hybridisieren kann. Aufgrund dieser räumlichen Nähe besteht die Möglichkeit, dass die beiden Fluoreszenzmarkierungsgruppen ( $F_1$ ,  $F_2$ ) als Fluoreszenzdonor- und Fluoreszenzakzeptorgruppen wirken, so dass bei Anregung der ersten Gruppe ein Energietransfer auf die zweite Gruppe erfolgt und eine von der zweiten Gruppe emittierte Fluoreszenzstrahlung nachgewiesen werden kann.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten durch Kreuzkorrelation oder Koinzidenzanalyse mittels optischer Anregung von mehreren lumineszierenden, z.B. fluoreszierenden

- 14 -

Molekülen in mindestens einem konfokalen Detektionsvolumen, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Probe, umfassend verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen,
- 5 (b) Bestrahlen der Probe mit einer optischen Anregungs- und Fokussiereinrichtung, umfassend mehrere separate Lichtquellen jeweils zur Anregung einzelner Spezies von lumineszierenden Molekülen in mindestens einem konfokalen Detektionsvolumen, das Teil der Probe ist,
- 10 wobei die Einstrahlung von einzelnen Lichtquellen zu jeweils verschiedenen Zeitintervallen und repetitiv erfolgt und
- (c) Auffangen von Emissionsstrahlung aus dem mindestens einen Messvolumen durch einen oder mehrere Detektoren und Auswerten der aufgefangenen Strahlung,
- 15 wobei Signale, die während eines Zeitintervalls aufgefangen werden, in dem eine erste Spezies von lumineszierenden Molekülen angeregt wird, die aber von einer zweiten Spezies stammen, bei der Auswertung nicht berücksichtigt bzw. herausgefiltert werden.

20 **Figur 2** zeigt eine Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung. Dabei werden 2 spektral unterschiedliche lumineszierende Markierungsgruppen, z.B. eine grüne (g) und eine rote (r) Fluoreszenzmarkierungsgruppe, sequenziell in kurzen Taktintervallen angeregt, die in der Größenordnung der Totzeit des Detektors sind. Zur Anregung werden jeweils grüne (g) und

25 rote (r) Laserpulse verwendet.

Die auf dem oder den Detektor(en) auftreffenden Photonen werden ausgewertet. Ein "korrektes" Signal ist, wenn bei einem grünen Laserpuls ein grünes Photon (g) und bei einem roten Laserpuls ein rotes Photon (r)

30 aufgefangen wird. Wenn hingegen beispielsweise bei einem grünen Laserpuls ein rotes Photon (r\*) aufgefangen wird, handelt es sich um eine unerwünschte Interferenz (Crosstalk). Dieses - mit herkömmlichen

- 15 -

Methoden nicht auflösbare - Ereignis kann durch geeignete elektronische Maßnahmen aus dem Gesamtsignal herausgefiltert werden, wodurch eine neue Korrelations- bzw. Koinzidenzkurve ermittelt werden kann. Auf diese Weise wird eine signifikante Verringerung des Hintergrunds erreicht.

5



### Ansprüche

- 5     1.     Verfahren zur Bestimmung eines Nukleinsäure-Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:
- (a)     Bereitstellen einer Probe, die den Analyten enthalten kann,
- (b)     Bereitstellen von mindestens zwei mit dem Analyten  
10                bindefähigen Hybridisierungssonden, die jeweils unterschiedliche Markierungsgruppen tragen, und, wenn sie nicht an den Analyten gebunden sind, in einer Hairpinstruktur umfassend einen Stem mit zwei zueinander komplementären Abschnitten und einen Loop umfassend die mit den Analyten bindefähige Sequenz vorliegen,
- 15                wobei eine erste Hybridisierungssonde benachbart von einer zweiten Hybridisierungssonde an den Analyten binden kann, wobei die Markierungsgruppen der beiden Hybridisierungssonden derart angeordnet sind, dass sie, wenn die Sonden an den Analyten gebunden sind, eine Wechselwirkung miteinander eingehen können,
- 20                wobei die Sequenzen in den Stems der ersten und zweiten Hybridisierungssonden untereinander komplementär sind, dass, wenn die Sonden an den Analyten gebunden sind, eine Hybridisierung zwischen Sequenzen aus den Stems aus der ersten und der zweiten Sonde erfolgen kann,
- 25                (c)     Inkontaktbringen der Probe mit den Hybridisierungssonden unter Bedingungen, bei denen eine Hybridisierung der Sonden mit dem Analyten erfolgen kann, und
- (d)     Nachweisen der gleichzeitigen Hybridisierung von mindestens  
30                zwei Sonden mit dem Analyten.

- 17 -

2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Hybridisierungssonden Fluoreszenzmarkierungsgruppen  
tragen, die sich in mindestens einem Messparameter, insbesondere  
5 ausgewählt aus Emissionswellenlänge oder/und Lebensdauer der  
Fluoreszenz, unterscheiden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 dass Schritt (d) den Nachweis eines Energietransfers zwischen den  
Markierungsgruppen der ersten und zweiten Sonden umfasst.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
15 dass man Hybridisierungssonden verwendet, wobei die erste Sonde  
an einen Bereich des Analyten bindet, der unmittelbar 3'-seitig  
desjenigen Bereichs liegt, an den die zweite Sonde bindet.
5. Verfahren nach Anspruch 4,  
20 dadurch gekennzeichnet,  
dass die erste Sonde ihre Markierungsgruppe am 3'-Ende und die  
zweite Sonde ihre Markierungsgruppe am 5'-Ende enthält.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
25 dadurch gekennzeichnet,  
dass die Markierungsgruppe von zumindest einer Sonde eine  
geringere Signalstärke aufweist, wenn die Sonde nicht an den  
Analyten gebunden ist, als wenn die Sonde an den Analyten  
gebunden ist.

30

- 18 -

7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass das Signal der Markierungsgruppe durch eine Quenchgruppe  
zumindest teilweise gelöscht wird, wenn die Sonde nicht an den  
Analyten gebunden ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass Schritt (d) einen Nachweis durch konfokale Detektion umfasst.
9. Verfahren nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass der Nachweis eine Einzelmoleküldetektion umfasst.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 oder 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass Schritt (d) einen Nachweis durch Fluoreszenz-  
Korrelationsspektroskopie oder/und Time-Gating umfasst.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man eine einzige Lichtquelle zur Anregung der  
Markierungsgruppen verwendet.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man mehrere Lichtquellen zur Anregung der  
Markierungsgruppen verwendet.

- 19 -

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die zur Anregung der Markierungsgruppen verwendete(n)  
Lichtquelle(n) in Form von repetitiven Pulsen in die Probe  
eingestrahlt wird (werden).
14. Verfahren nach Anspruch 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Frequenz der Pulse im Bereich von 10 bis 0,1 MHz liegt.
15. Reagenzienkit zur Bestimmung von Nukleinsäureanalyten, umfassend  
mindestens zwei mit dem Analyten bindefähige  
Hybridisierungssonden, die jeweils unterschiedliche  
Markierungsgruppen tragen, und, wenn sie nicht an den Analyten  
gebunden sind, in einer Hairpinstruktur umfassend einen Stem mit  
zwei zueinander komplementären Abschnitten und einen Loop  
umfassend die mit den Analyten bindefähige Sequenz vorliegen,  
wobei eine erste Hybridisierungssonde benachbart von einer zweiten  
Hybridisierungssonde an den Analyten binden kann,  
wobei die Markierungsgruppen der beiden Hybridisierungssonden  
derart angeordnet sind, dass sie, wenn die Sonden an den Analyten  
gebunden sind, eine Wechselwirkung miteinander eingehen können,  
wobei die Sequenzen in den Stems der ersten und zweiten  
Hybridisierungssonden untereinander komplementär sind, dass,  
wenn die Sonden an den Analyten gebunden sind, eine  
Hybridisierung zwischen Sequenzen aus den Stems aus der ersten  
und der zweiten Sonde erfolgen kann.
16. Verwendung eines Reagenzienkits nach Anspruch 15 in einem  
Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

- 20 -

17. Verfahren zur Bestimmung eines Analyten durch Kreuzkorrelation oder Koinzidenzanalyse mittels optischer Anregung von mehreren lumineszierenden Molekülen in mindestens einem konfokalen Detektionsvolumen, umfassend die Schritte:

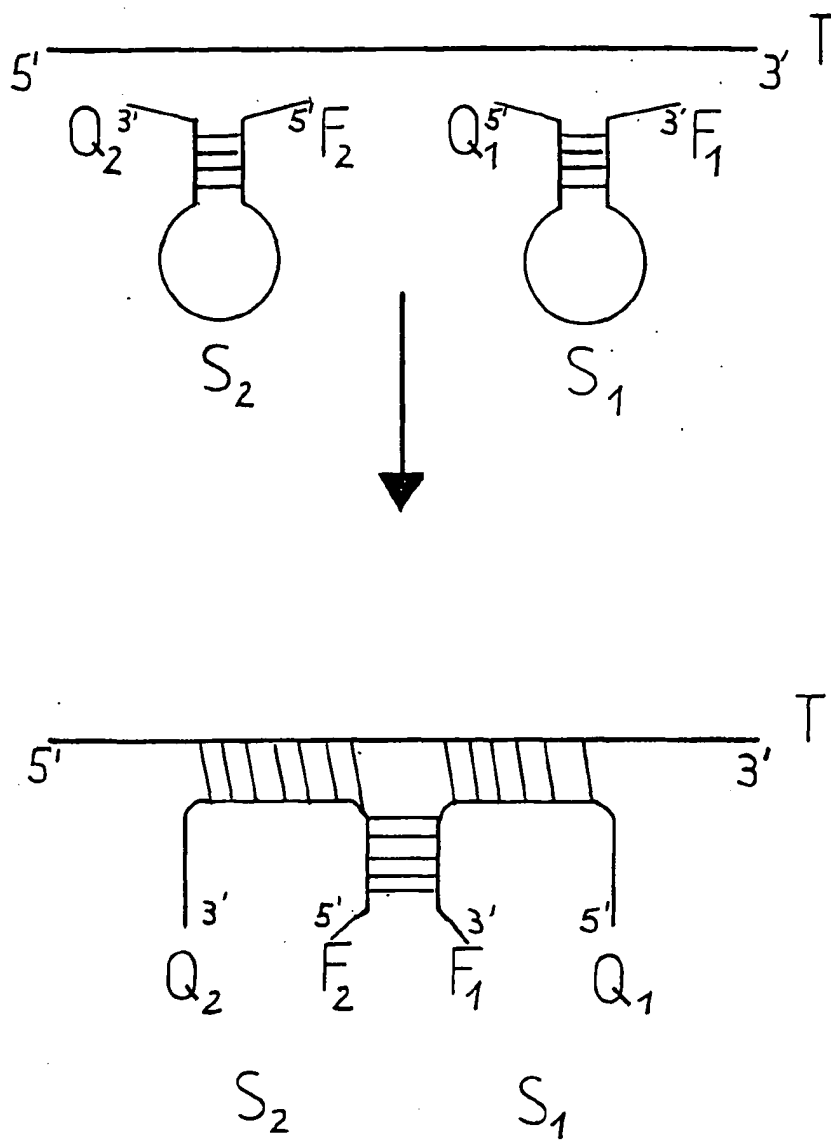
- 5 (a) Bereitstellen einer Probe, umfassend verschiedene Spezies von lumineszierenden Molekülen,
- (b) Bestrahlen der Probe mit einer optischen Anregungs- und Fokussiereinrichtung, umfassend mehrere separate Lichtquellen jeweils zur Anregung einzelner Spezies von lumineszierenden Molekülen in mindestens einem konfokalen Detektionsvolumen, das Teil der Probe ist, wobei die Einstrahlung von einzelnen Lichtquellen zu jeweils verschiedenen Zeitintervallen und repetitiv erfolgt und
- 10 (c) Auffangen von Emissionsstrahlung aus dem mindestens einen Messvolumen durch einen oder mehrere Detektoren und Auswerten der aufgefangenen Strahlung, wobei Signale, die während eines Zeitintervalls aufgefangen werden, in dem eine erste Spezies von lumineszierenden Molekülen angeregt wird, die aber von einer zweiten Spezies stammen, bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.
- 15
- 20

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Zeitintervalle jeweils im Bereich von 0,1-10  $\mu$ s liegen.

25

-1/2-

Figur 1



-2/2-

Figur 2

